

University of Groningen

## **Lysine analoga; bereiding en enzymatische hydrolyse van peptide derivaten van lysine en lysine analoga**

Tesser, Godefridus Ignatius

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1961

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Tesser, G. I. (1961). *Lysine analoga; bereiding en enzymatische hydrolyse van peptide derivaten van lysine en lysine analoga*. s.n.

### **Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### **Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## SAMENVATTING

In deze dissertatie werd de synthese van enkele structuuranaloga van lysine beschreven. Aangetoond werd, dat zij lysine in substraten voor trypsine, cathepsine B en papaine konden vervangen. Daar de structuur van de analoga O-( $\beta$ -aminoethyl)serine en S-( $\beta$ -aminoethyl)cysteine die van lysine dicht benadert, werd voor deze isosteren de benaming 4-oxalysine en 4-thialysine voorgesteld.

Bijde synthese van 4-oxalysine bleek, dat de aetherbinding in intermediaire verbindingen en in het aminozuur zelf labiel was in alkalisch milieu. De waargenomen ontledingen kunnen aan  $\beta$ -eliminatie van de aminoethoxy-groep worden toegeschreven. Door keuze van malonaten als uitgangsmateriaal kon de  $\beta$ -eliminatie onmogelijk gemaakt worden, zodat op deze wijze een synthese voor DL-4-oxalysine kon worden uitgewerkt.

Voor de racematensplitsing werd het aminozuur omgezet in het di-phthaloylderivaat. De diastereoisomere brucinezouten van het zo verkregen zuur konden door kristallisatie in tegenwoordigheid van isoamylalcohol worden gescheiden. Het minst oplosbare zout bleek gesolva-teerd te zijn met isoamylalcohol. De configuratie van beide antipoden werd bepaald met de methode der quasi-racematen. De antipode, die geïsoleerd werd uit het minst oplosbare brucinezout, bleek de D-configuratie te bezitten. De optische activiteit van deze verbindingen gaat verloren bij milde alkalische hydrolyse van de phthaloylgroepen. De ionisatie van het H-atoom aan  $C_{\alpha}$ , die de vorming van een carbanion inhoudt, werd hiervan als oorzaak beschouwd. Door hydrolyse in sterk zuur milieu werd tenslotte optisch actief 4-oxalysine verkregen, de configuratie hiervan werd met behulp van rotatie dispersie vastgesteld. Ook hier werd gevonden, dat de antipode - overeenkomend met het minst oplosbare diastereoisomere zout - de D-configuratie had.

De gegeven synthese van L-4-thialysine is een variant op de S-benzylcysteïne synthese van du Vigneaud. Het product bleek minder alkali-gevoelig te zijn.

Om de vervangbaarheid van lysine met deze isosteren ten opzichte van trypsine en de andere enzymen te kunnen onderzoeken, werden de aminozuren, waarin de  $\epsilon$ -aminogroep was gesubstitueerd, met methylalcohol veresterd, met de phthaloylglycylrest geacyleerd en daarna ontdaan van de substituent aan de  $\epsilon$ -aminogroep. Een diastereoisomeer substraat van 4-oxalysine, dat volledig door trypsine gesplitst kon worden, werd verkregen door substitutie van de  $\alpha$ -aminogroep in  $N_{\epsilon}$ -benzyloxycarbonyl-DL-4-oxalysine methylester met de phthaloyl-L-alanyl rest, scheiding van de diastereoisomeren en verwijdering van de beschermende groep aan  $N_{\epsilon}$ .

De basesterkte van de  $\epsilon$ -aminogroep in de substraten neemt af in de reeks: lysine > 4-thialysine > 4-oxalysine.

Met behulp van de methode van Lineweaver en Burk werd de maximale hydrolysesnelheid en de Michaelis constante voor bovengenoemde substraten met trypsine, cathepsine B en papaine bepaald.

Uit de waarden, die voor de kinetische grootheden gevonden werden, bleek, dat trypsine op een geheel andere wijze met deze substraten reageerde dan papaine en cathepsine B. Deze beide laatstgenoemde enzymen vertoonden bij de hydrolyse een grote overeenkomst. De maximale hydrolysesnelheid bleek af te nemen in de volgorde: thialysine- > lysine- > oxalysine-substraat, bij trypsine werd echter de volgorde: lysine- > oxalysine- > thialysine-substraat gevonden.

De Michaelis constante heeft dezelfde orde van grootte voor de "thiol" enzymen, maar heeft voor trypsine zeer uiteenlopende waarden:

$$K_M(\text{LYS}) < K_M(\text{S-LYS}) < K_M(\text{O-LYS}).$$

Een interpretatie van deze resultaten, gebaseerd op de chemische of fysisch-chemische eigenschappen van deze analoga is echter thans nog niet te geven.

## S U M M A R Y

In this dissertation the synthesis of some structural analogs of lysine has been described. It was demonstrated that they could replace lysine in substrates for trypsin, cathepsin B and papain. As the structure of these analogs, O-( $\beta$ -aminoethyl)serine and S-( $\beta$ -aminoethyl)cysteine, closely resembles that of lysine, the names 4-oxalysine and 4-thialysine were proposed for these isosteres.

Preliminary experiments performed to obtain a reasonable synthesis of DL-4-oxalysine, exhibited a high lability of the ether bond in synthetic precursors, and in the oxalysine molecule itself in alkaline media. The observed cleavage was ascribed to  $\beta$ -elimination of the aminoethoxy-group. By choosing a malonate as starting material, the  $\beta$ -elimination could be avoided and only in this way a good synthesis could be effected.

For the resolution of the racemic compound the amino acid was converted into the diphthaloyl derivate and the diastereoisomeric salts of the obtained acid could be separated by crystallization from several solvents in the presence of isoamylalcohol. The less soluble salt proved to be solvated with this alcohol. Determination of the configuration was performed by the method of the quasi-racemates. The antipode forming the less soluble brucine salt, proved to be the D-form. The optical activity of this compound is lost during mild alkaline hydrolysis of the phthaloyl groups. This is probably caused by temporarily conversion of the asymmetric C-atom into a carbanion, which racemizes immediately.

By hydrolysis in strongly acidic medium the optically active amino acid was obtained. Its configuration was established by rotatory dispersion.

The given synthesis of L-4-thialysine is a variation of the S-benzylcysteine synthesis by du Vigneaud. This product was much more stable in alkaline media.

In order to investigate the replacability of lysine by these two isosteres, in substrates for trypsin, cathepsin B and papain, these amino acids in which the  $\epsilon$ -amino-group was protected, were esterified with methylalcohol, and acylated with the phthaloylglycyl residue. Subsequent removal of the protecting group in the  $\epsilon$ -position yielded the free substrates. A diastereoisomeric substrate containing 4-oxalysine, which was completely hydrolysable by trypsin, was obtained by substitution of the partially protected ester with the phthaloyl-L-alanyl residue, separation of the diastereoisomeric dipeptide derivatives and removal of the protecting group in  $\epsilon$ -position as before.

The basic character of the  $\epsilon$  aminogroup decreases in the sequence lysine > 4-thialysine > 4-oxalysine.

Using the method of Lineweaver and Burk, the maximal hydrolysis rate and the Michaelis constant were determined for the substrates with trypsin, cathepsin B and papain.

The rate of the enzymic hydrolysis of the above mentioned substrates was measured by continuous titration in a pH-stat. The kinetic data (par. V-6) show that trypsin acts in a completely different way than papain and cathepsin B, which are very similar in this respect. The maximal velocity of the hydrolysis, catalysed by these last two enzymes, decreases in the order thialysine- > lysine- > oxalysine-substrate, whereas for trypsin the order lysine- > 4-oxalysine- > thialysine-substrate was found.

The Michaelis constant is of the same order of magnitude for the "thiol" enzymes, but is widely diverging for trypsin:

$$K_M (\text{LYS}) < K_M (\text{S-LYS}) < K_M (\text{O-LYS}).$$

So far we have not been able to correlate these data with the chemical and physico-chemical properties of the analogs.

2750  
—  
1961